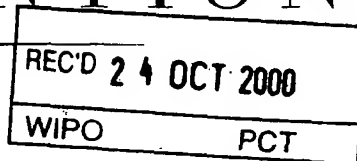


10/088293
FILOO/2565

BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

4

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 09 OCT. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA REGLE
17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES 17 SEPT 1999 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 9911684 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 INPI PARIS B DATE DE DÉPÔT 17 SEP. 1999		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS									
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°		n° du pouvoir permanent références du correspondant 1 MJPcb191/162FR 1 date									
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non											
Titre de l'invention (200 caractères maximum) PROCEDE DE MODIFICATION GENETIQUE DE LACTOBACILLUS DELBRUECKII											
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 1 code APE-NAF 1 Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination 1/ INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) 2/ COMPAGNIE GERVAIS DANONE 3/ SOCIETE TEXEL		Forme juridique									
Nationalité (s) Française Adresse (s) complète (s) 1/ 147 rue de l'Université, 75338 PARIS CEDEX 07 2/ 126-130 rue Jules Guesde, 92302 LEVALLOIS PERRET 3/ Zone d'Activité de Buxières, 86220 DANGE SAINT ROMAIN		Pays FRANCE FRANCE FRANCE									
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>											
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée											
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission											
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° 1 date 17 SEP. 1999 n° 1 date 17 SEP. 1999											
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) VIALLE-PRESLES Marie-José (N°93-2009)		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI									

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

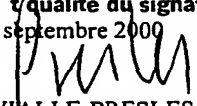
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 3..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

V s références pour ce dossier (facultatif)		MJPCb191/162FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 11684	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
PROCEDE DE MODIFICATION GENETIQUE DE LACTOBACILLUS DELBRUECKII			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
- INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)			
- COMPAGNIE GERVAIS DANONE			
- SOCIETE TEXEL			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		SERROR	
Prénoms		Pascale	
Adresse	Rue	6, rue des Coloristes	
	Code postal et ville	78350	JOUY-EN-JOSAS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		ILAMI-NESPOULOS	
Prénoms		Golnar	
Adresse	Rue	53, allée de la Ferme d'Armenon	
	Code postal et ville	91190	GIF-SUR-YVETTE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VAN DE GUCHTE	
Prénoms		Maarten	
Adresse	Rue	9, square Raphaël	
	Code postal et ville	78150	LE CHESNAY
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le 19 septembre 2000  M.J. VIALLE-PRESLES (n° 93-2009)			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

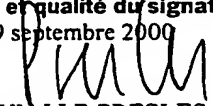
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 3. .

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPCb191/162FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 11684	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
PROCÉDE DE MODIFICATION GENETIQUE DE LACTOBACILLUS DELBRUECKII			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
- INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)			
- COMPAGNIE GERVAIS DANONE			
- SOCIÉTÉ TEXEL			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CHERVAUX	
Prénoms		Christian	
Adresse	Rue	31, rue de la Bièvre	
	Code postal et ville	78350	BUC
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		FREMEAUX	
Prénoms		Christophe	
Adresse	Rue	19, rue des Joncs	
	Code postal et ville	86000	POITIERS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BENBADIS	
Prénoms		Laurent	
Adresse	Rue	7, avenue de Provence	
	Code postal et ville	92160	ANTONY
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (N m en qualité du signataire) Le 19 septembre 2000  M.J. VIALLE-PRESLES (n° 93-2009)			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 3. / 3..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPcb191/162FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 11684	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
PROCEDE DE MODIFICATION GENETIQUE DE LACTOBACILLUS DELBRUECKII			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
- INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)			
- COMPAGNIE GERVAIS DANONE			
- SOCIETE TEXEL			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MAGUIN	
Prénoms		Emmanuelle	
Adresse	Rue	16, avenue du Fort	
	Code postal et ville	92120	MONTRouGE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (N m t qualité du signataire) Le 19 septembre 2000			
M.J. VIALLE-PRESLES (n° 93-2009)			

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p. 21			X	21-04-00	26 AVR. 2000 - VD

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

PROCEDE DE MODIFICATION GENETIQUE DE LACTOBACILLUS
DELBRUECKII

La présente invention est relative à la modification génétique de *Lactobacillus delbrueckii*.

5 Les bactéries lactiques sont très utilisées en industrie agroalimentaire, particulièrement pour la fabrication de divers produits fermentés ; en outre, leur innocuité a fait préconiser leur utilisation pour la production par génie génétique de diverses substances
10 destinées notamment à une utilisation thérapeutique.

La modification génétique des bactéries lactiques permet d'adapter leurs caractéristiques selon l'utilisation envisagée, que ce soit par l'introduction et l'expression d'ADN étranger, ou par la surexpression
15 ou au contraire l'inactivation de gènes naturellement présents chez lesdites bactéries. Pour qu'une modification soit stable, elle doit être intégrée dans le chromosome bactérien. Dans ce but, la modification souhaitée est insérée dans un plasmide non-réplcatif
20 portant un marqueur de sélection. Le vecteur ainsi obtenu est introduit dans les bactéries ; on récupère ensuite les bactéries exprimant le marqueur de sélection, qui sont celles qui ont intégré le vecteur dans leur chromosome.

25 La modification résulte de 2 événements de faible fréquence : 1) l'introduction du plasmide réplcatif dans les bactéries ; 2) l'intégration dudit plasmide par recombinaison dans le chromosome. Le taux de modification que l'on peut espérer est le produit des
30 probabilités de ces deux événements ; il est donc très faible, surtout dans le cas de bactéries appartenant à des espèces dites « réfractaires » à la transformation, ce qui est le cas de nombreuses espèces de bactéries lactiques. Parmi celles-ci on mentionnera en particulier
35 l'espèce *Lactobacillus delbrueckii*, qui comprend notamment les sous-espèces *Lb. delbrueckii* subsp.

bulgaricus, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, et *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*.

Un seul exemple de vecteur permettant l'intégration dans le chromosome de *Lb. delbrueckii* est décrit dans l'art antérieur : il s'agit du plasmide conjugatif pAM β 1, décrit comme non-réplcatif chez *Lb. delbrueckii*. La Demande EP 0603416 au nom de MEIJI MILK PRODUCTS CO. LTD rapporte l'utilisation de ce plasmide pour intégrer une modification dans le chromosome de *Lb. delbrueckii* : un marqueur de sélection (résistance à l'érythromycine), a été inséré dans un fragment homologue à une région du chromosome de *Lb. delbrueckii*, et l'ensemble a été introduit dans le plasmide pAM β 1. Le plasmide intégratif ainsi construit a été multiplié chez *Lactococcus lactis*, puis transféré par conjugaison chez *Lb. delbrueckii* ; les transconjugants/intégrants sont ensuite sélectionnés sur la base de la résistance à l'érythromycine résultant de l'intégration, par recombinaison homologue, de l'insert du plasmide dans l'ADN chromosomique.

Ces modifications étant obtenues à très faible fréquence, il est souhaitable de disposer d'autres vecteurs intégratifs adaptés à *Lb. delbrueckii* et facilitant l'obtention des souches modifiées et la sélection des intégrants.

Pour augmenter le taux de modification et faciliter le criblage des bactéries modifiées, il a été proposé chez certaines bactéries lactiques d'utiliser comme vecteurs des plasmides à réplcation thermosensible [BISWAS et al., J. Bacteriol., 175, 3628-3635, (1993) ; MAGUIN et al., J. Bacteriol., 178, 931-935, (1996)]. La Demande PCT WO 93/18164 décrit ainsi des vecteurs intégratifs qui sont des dérivés thermosensibles (Ts) du plasmide pWV01, les plasmides comprenant le système de réplcation du réplicon mutant pVE6002 (CNCM I-1179), sont porteurs d'une mutation au niveau de la séquence

codant la protéine RepA. Ils se répliquent normalement à 28°C chez un grand nombre de bactéries ; en revanche leur répllication est inactivée à 37°C. La modification peut ainsi être effectuée en deux étapes : dans la première, le plasmide est introduit à température permissive dans les bactéries, ce qui permet une première sélection de celles dans lesquelles il s'est établi ; dans la seconde, ces bactéries sont cultivées à température non-permissive pour la répllication du plasmide, ce qui permet de sélectionner celles dans lesquelles les séquences introduites sont intégrées dans le chromosome.

L'utilisation de plasmides thermosensibles a ainsi permis d'obtenir des intégrants chez diverses espèces de bactéries lactiques, notamment de lactocoques. La Demande PCT WO 93/18164 décrit également l'introduction par conjugaison chez *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* d'un dérivé de pVE6002 portant le locus de mobilisation oriT de pIP501. Quelques transconjuguants ont été obtenus, mais aucune intégration de dans le chromosome de *Lb. delbrueckii* n'a été démontrée.

En poursuivant leurs recherches, les Inventeurs ont à présent constaté que plusieurs plasmides utilisés dans d'autres bactéries lactiques étaient capables de se répliquer dans *Lb. delbrueckii* à 37°C, qui est une température permettant la croissance de cette espèce, mais étaient thermosensibles à des températures plus élevées, généralement à partir de 42°C, température optimale de croissance de cette espèce.

Il s'agit notamment :

- de dérivés du réplicon mutant pVE6002 tels que ceux décrits dans la Demande PCT WO 93/18164. Les Inventeurs ont constaté que ces plasmides se répliquent normalement à 37°C chez *Lb. delbrueckii*, mais sont instables à partir de 42°C, probablement du fait de l'inactivation de leur répllication.

- de dérivés du plasmide pIP501 ; il a été montré que ce plasmide peut être transféré par conjugaison chez *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et s'y répliquer [LANGELLA et CHOPIN, FEMS Microbiol. Lett., 60, 149-152, (1989)]. Il a été décrit comme thermosensible chez *B. subtilis* et plusieurs lactobacilles dont *L. helveticus* [BHOWMICK et STEELE, J. Gen. Microbiol., 139, 1433-1439, (1993)], *L. plantarum* [RIXON et al., FEMS Microbiol. Lett., 71, 105-110, (1990)] et *L. acidophilus* [LUCHANSKI et al., Mol. Microbiol., 2, 637-646, (1988)] mais pas chez *Lb. delbrueckii*. Les Inventeurs ont établi que pIP501 et des dérivés de celui-ci peuvent se répliquer à 37°C, mais sont instables à partir de 42°C chez *Lb. delbrueckii*.

Des dérivés de ces plasmides thermosensibles ont été utilisés par les Inventeurs pour transformer *Lb. delbrueckii* et ont permis à température non-permissive, d'obtenir des intégrants, et de démontrer ainsi la possibilité d'utiliser chez *Lb. delbrueckii* des plasmides à stabilité conditionnelle en tant que vecteurs d'intégration.

La présente invention a en conséquence pour objet l'utilisation d'un plasmide conditionnel en tant que vecteur d'intégration pour introduire une modification de l'information génétique d'une bactérie de l'espèce *Lb. delbrueckii*. Cette modification est introduite dans le chromosome via un ou plusieurs évènements de transposition et/ou de recombinaison homologue.

On qualifie ici de « conditionnel » un vecteur, par exemple un plasmide, dont au moins l'une des fonctions de réplication, de partition, ou de stabilité n'est active que dans certaines conditions (par exemple de température, de pH, de concentration en sels minéraux, de présence dans le milieu de culture d'un composé particulier, etc.) soit du fait qu'une ou plusieurs des

protéines intervenant dans cette fonction comporte(nt) une ou des mutation(s) rendant l'activité conditionnelle, soit du fait qu'une ou plusieurs des protéines intervenant dans cette fonction sont placées sous
5 contrôle d'un promoteur inductible.

En particulier la présente invention a pour objet un procédé pour modifier l'information génétique portée par le chromosome d'une bactérie de l'espèce *Lb delbrueckii*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 10 a) la construction d'un plasmide intégratif, par insertion d'au moins une séquence d'ADN capable de s'intégrer dans le chromosome bactérien, dans un vecteur conditionnel chez ladite bactérie, ledit vecteur portant en outre au moins un marqueur de sélection ;
- 15 b) l'introduction du plasmide dans ladite bactérie et la multiplication de celle-ci, en conditions permissives pour la répllication et le maintien sous forme stable dudit plasmide ;
- 20 c) la multiplication des bactéries exprimant au moins un marqueur de sélection du plasmide à l'issue de l'étape b), en conditions non-permissives pour la répllication et/ou le maintien sous forme stable duplasmide ; et optionnellement,
- 25 d) la récupération des bactéries exprimant au moins un marqueur de sélection provenant du plasmide, à l'issue de l'étape c).

Avantageusement, on peut, après avoir obtenu des bactéries portant la modification souhaitée, éliminer des séquences provenant du vecteur mis en œuvre à l'étape
30 a), dans les cas où il n'est pas souhaitable de conserver ces séquences, par exemple dans le cas de bactéries destinées à une utilisation industrielle, notamment à la préparation d'aliments.

Dans ce cas le procédé conforme à l'invention
35 comprend en outre les étapes suivantes :

e) l'excision des séquences provenant du vecteur, par multiplication des bactéries exprimant, à l'issue de l'étape c), au moins un marqueur de sélection provenant du plasmide, et avantageusement,

- 5 f) l'élimination de l'ADN excisé, par multiplication des bactéries obtenues à l'étape e) en conditions non-permissives pour la réplication et le maintien du vecteur sous forme plasmidique stable.

Des vecteurs conditionnels chez *Lb.*
 10 *delbrueckii* utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention sont par exemple des plasmides thermosensibles, avantageusement des plasmides capables de se répliquer et de se maintenir à 37°C dans cette
 15 espèce bactérienne, et dont la réplication et/ou le maintien sous forme stable sont inhibés à partir de 42°C environ.

On pourra utiliser notamment ;

- des plasmides comprenant le système de
 20 réplication de pVE6002 ;
- des plasmides comprenant le système de
 réplication thêta de pIP501.

Ces plasmides portent en outre au moins un marqueur de sélection, à savoir un gène pouvant s'exprimer chez *Lb. delbrueckii* et dont l'expression
 25 confère aux bactéries l'hébergeant un phénotype distinctif permettant leur sélection. Il peut s'agir par exemple d'un marqueur de résistance, conférant un caractère de résistance à une substance habituellement toxique pour la bactérie, par exemple un antibiotique, ou
 30 bien d'un marqueur d'auxotrophie conférant la capacité de croître en l'absence d'un nutriment habituellement indispensable à la bactérie. Les bactéries exprimant ces marqueurs sont par exemple facilement sélectionnées par leur survie sur milieu sélectif, à savoir en présence de
 35 ladite substance toxique ou en l'absence dudit nutriment.

Ainsi, à l'issue de l'étape b) du procédé ci-dessus, les bactéries dans lesquelles le plasmide est présent peuvent être sélectionnées sur la base de l'expression d'un marqueur de sélection provenant du plasmide. De même, à l'issue de l'étape c), les bactéries dans lesquelles l'ADN du plasmide a été intégré au chromosome peuvent être sélectionnées sur la base de l'expression d'un marqueur de sélection provenant du plasmide construit à l'étape a).

- 10 Une autre possibilité de sélection à l'issue de l'étape c) consiste à utiliser une propriété de la souche qui découle de l'intégration du plasmide et/ou de l'excision des séquences du vecteur. Par exemple, on peut utiliser un plasmide conditionnel comprenant un marqueur de
- 15 sélection M (par exemple un marqueur de résistance), et une séquence d'ADN capable de s'intégrer par recombinaison homologue dans un gène bactérien X, ledit gène X étant indispensable dans certaines conditions pour la bactérie (par exemple un gène essentiel pour sa
- 20 croissance sur un milieu donné), l'intégration du plasmide inactivant le gène X, et l'excision des séquences du vecteur restaurant son activité. Dans ce cas, les bactéries dans lesquelles l'ADN plasmidique a été intégré peuvent être sélectionnées sur la base de
- 25 l'expression du marqueur de sélection M, en conditions dans lesquelles le gène X n'est pas indispensable, et les bactéries dans lesquelles les séquences du vecteur intégré ont été excisées peuvent être sélectionnées, en conditions dans lesquelles le gène X est indispensable,
- 30 sur la base de la restauration de son activité. Ce mode de sélection permet également en outre de sélectionner en une seule étape des bactéries dans lesquelles l'intégration de l'ADN plasmidique et l'excision des séquences du vecteur ont eu lieu ; dans ce cas les
- 35 bactéries sont directement cultivées en conditions dans lesquelles le gène X est indispensable, et qui sont

également sélectives pour le marqueur M. Les bactéries sélectionnées seront celles dans lesquelles l'intégration du plasmide et l'excision des séquences du vecteur (y compris le marqueur M) ont restauré l'activité du gène X.

5 Des séquences d'ADN capables de s'intégrer dans le chromosome d'une bactérie de l'espèce *Lb. delbrueckii* comprennent notamment :

- des séquences choisies sur la base de leur homologie avec une portion du chromosome où l'on souhaite introduire une modification, c'est à dire présentant une homologie suffisante avec cette portion du chromosome pour pouvoir recombinaison avec elle ;
- des séquences transposables, notamment des transposons ou des séquences d'insertion (IS) ; de telles séquences peuvent s'insérer au hasard ou avec une certaine spécificité dans le chromosome bactérien.

Les modifications que l'on souhaite intégrer dans le chromosome bactérien peuvent être apportées par la simple intégration de ces séquences, celle-ci pouvant par exemple entraîner l'inactivation d'un gène à l'intérieur duquel elle s'effectue. Il est également possible d'utiliser ces séquences pour intégrer un fragment d'ADN, notamment un gène d'intérêt d'origine hétérologue, ou un fragment d'ADN de *Lb. delbrueckii* préalablement modifié, dans le chromosome bactérien.

Dans le cas de l'intégration par recombinaison homologue, par exemple, on peut apporter à l'intérieur d'une séquence identique à celle de la région du chromosome que l'on souhaite modifier, des modifications par insertion, délétion, ou substitution, pouvant aller d'un seul nucléotide à plusieurs milliers de nucléotides. La séquence ainsi modifiée est insérée dans un vecteur conditionnel chez *Lb. delbrueckii* à l'étape a) du procédé selon l'invention. L'intégration s'effectue par

recombinaison (simple crossing-over) entre le fragment d'ADN chromosomique cloné et la région homologue du chromosome bactérien. Cet événement de recombinaison créant des duplications de la région d'homologie, de part et d'autre des séquences du vecteur, la structure intégrée dans le chromosome est constituée des séquences du vecteur encadrées de part et d'autre par une copie de la région d'homologie, comme le montre la Figure 1.

L'utilisation de séquences pouvant s'intégrer par recombinaison homologue permet notamment :

- d'inactiver un (ou des) gène(s) bactérien(s) ;
- de modifier l'expression des gènes et/ou l'activité des produits codés par ces gènes ;
- d'introduire, de façon stable, de nouvelles fonctions dans le chromosome ;
- d'étudier l'expression des gènes *in situ* ;
- de muter le chromosome par intégration via des fragments chromosomiques aléatoires ;
- d'insérer, de façon stable, des séquences destinées à marquer les souches. Ces séquences serviront par la suite de traceurs ;
- d'introduire plusieurs modifications séquentielles dans une même souche.

Dans le cas de l'intégration par l'intermédiaire d'une séquence transposable, la séquence transposable sera insérée dans le plasmide ; l'intégration dans le chromosome permet de réaliser la modification, d'obtenir ainsi des mutants présentant des caractères intéressants et de caractériser plus aisément le ou les gène(s) muté(s). En cas de transposition répllicative, la structure transposée dans le chromosome, est constituée des séquences du vecteur encadrées de part et d'autre par une copie de la séquence transposable.

Ces séquences transposables peuvent provenir de bactéries appartenant à l'espèce *Lb. delbrueckii*, ou

provenir d'autres espèces bactériennes, notamment d'autres bactéries lactiques. Il peut s'agir de transposons ou de séquences d'insertion.

Des séquences transposables fonctionnelles
5 chez *Lb. delbrueckii* peuvent être identifiées en insérant une séquence transposable à tester (transposon ou séquence d'insertion), dans un vecteur à répllication conditionnelle chez *Lb. delbrueckii*, tel que défini ci-dessus, en mettant en œuvre les étapes b) et c) du
10 procédé conforme à l'invention, et en recherchant la présence de transposants à l'issue de ces étapes.

Les Inventeurs ont ainsi mis en évidence 2 séquences d'insertion utilisables conformément à l'invention pour modifier le chromosome de *Lb.*
15 *delbrueckii*.

Il s'agit de la séquence d'insertion dénommée IS1223 précédemment mise en évidence par WALKER et al. (J. Bacteriol., 176, 5330-5340, 1994) chez *Lb. johnsonii*, et de la séquence d'insertion dénommée IS1201,
20 précédemment mise en évidence par TAILLIEZ et al. (Gene, 145, 75-79, 1994) chez *Lb. helveticus*.

La présente invention a également pour objet des plasmides intégratifs résultant de l'insertion de l'une de ces 2 séquences dans un vecteur à répllication
25 conditionnelle chez *Lb. delbrueckii*, et notamment dans un vecteur comprenant le système de répllication de pVE6002, ou dans un vecteur comprenant le système de répllication thêta de pIP501.

Selon un mode de réalisation préféré de la
30 présente invention, ledit vecteur est un vecteur non-conjugatif.

Des plasmides intégratifs conformes à l'invention sont notamment illustrés par le plasmide pVI49 et le plasmide pVI52. Le plasmide pVI49 hébergé par
35 la souche VI209 de *Lb. delbrueckii*, et le plasmide pVI52, hébergé par la souche VI217 de *Lb. delbrueckii*, ont été

déposés selon le Traité de Budapest le 17 septembre 1999, sous les numéros respectifs I-2317 et I-2318, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), 25 rue du Docteur Roux, à Paris.

5 Dans les deux cas de figure : intégration par recombinaison homologue ou par transposition répllicative d'un élément mobile, l'excision des séquences provenant du vecteur s'effectue, au cours de l'étape e) du procédé conforme à l'invention, par recombinaison entre les
10 séquences homologues flanquant les séquences du vecteur.

Par exemple, dans le cas de l'intégration par recombinaison homologue, un second événement de recombinaison (double crossing-over) peut avoir lieu entre les régions homologues dupliquées de part et
15 d'autre des séquences du vecteur. Cet événement conduit à l'excision des séquences du vecteur, et permet, pour une fraction des clones, de substituer la forme sauvage chromosomique par la forme modifiée plasmidique comme le montre la Figure 1.

20 Légende de la Figure 1 :

A, B : ADN chromosomique cloné dans le vecteur ;

▲ : modification ;

RC : réplicon conditionnel ;

M : marqueur de sélection ;

25 P : conditions permissives

NP : conditions non-permissives.

Par exemple, dans le cas de l'intégration par certaines séquences transposables, par exemple des IS à transposition répllicative, celles-ci constituent
30 également de part et d'autre des séquences du vecteur, des régions homologues favorables à des événements de recombinaison qui conduisent à l'excision des séquences du vecteur, et de l'une des copies de l'IS, l'autre demeurant dans le chromosome bactérien au site de
35 transposition.

La Figure 2 représente l'excision des séquences d'un vecteur par recombinaison homologue entre des IS.

Légende de la Figure 2 :

- 5 I : séquence d'insertion ;
 M : marqueur de sélection ;
 P : conditions permissives ;
 NP : conditions non-permissives.

10 L'excision des séquences provenant du vecteur est favorisée lorsque celui-ci est un plasmide à répllication cercle roulant. Il a été montré que la recombinaison entre des duplications est fortement stimulée par la répllication (CR) d'un plasmide à proximité de celles-ci. (NOIROT et al., J. Mol. Biol.,
 15 196, 39-48, 1987).

On peut ainsi utiliser par exemple un plasmide thermosensible à répllication cercle roulant comprenant le système de répllication du réplicon pVE6002. Dans ce cas, les bactéries sélectionnées à température non permissive pendant l'étape c) ($>42^{\circ}\text{C}$), sont cultivées à température permissive (37°C). A cette température permissive, la répllication du plasmide thermosensible est induite et stimule la recombinaison entre les régions homologues flanquant les séquences du vecteur.

25 Après élimination des séquences excisées, conformément à l'étape f) du procédé conforme à l'invention, on obtient ainsi :

- dans le cas d'un plasmide comprenant une séquence capable de s'intégrer par recombinaison homologue, une bactérie
 30 différant de la bactérie-hôte d'origine par la présence, dans son chromosome, de la modification apportée par cette séquence ;
- dans le cas d'un plasmide comprenant une séquence transposable, une bactérie
 35 différant de la bactérie-hôte d'origine par

la présence, dans son chromosome, d'une copie de ladite séquence transposable. Lorsqu'une IS naturelle de *Lb. delbrueckii* est utilisée, la souche mutante peut être alors qualifiée de « mutant alimentaire».

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs d'obtention de plasmides intégratifs et de leur utilisation chez *Lb. delbrueckii*.

EXEMPLE 1 : SELECTION DE PLASMIDES THERMOSENSIBLES CHEZ *Lb. delbrueckii*

Obtention des plasmides

Plasmide à répllication thêta

Un plasmide navette *L. bulgaricus* - *E. coli* constitué de pGB3631 (un dérivé séquencé de pIP501, [BRANTL et al., Gene, 142, 455-156, (1994)]) et de l'origine pSKII de *E. coli* a été construit. Ce plasmide, dénommé pVI1055, est représenté sur la figure 3. Il porte un gène *ery* de résistance à l'érythromycine (Ery).

Un autre dérivé de pIP501, le plasmide pGB305A [LE CHATELIER et al., Plasmid, 29, 50-61, (1995)] a également été testé.

Plasmide à répllication cercle roulant

Les dérivés pVE6004 et pVG+host9 du réplicon mutant pVE6002 [MAGUIN et al., J. Bacteriol., 174, 5633-5638, (1992) ; Demande PCT WO 93/18164 ; MAGUIN et al., J. Bacteriol., 178, 931-935, (1996)] ont été utilisés.

Mise en évidence de la thermosensibilité chez *Lb. delbrueckii*

Transformation des bactéries

Des bactéries de la souche VI104 de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* déposée selon le Traité de Budapest le 17 septembre 1999, sous le numéro I-2316,

auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), 25 rue du Docteur Roux, à Paris, sont cultivées en milieu MRS, 0,1% glycine (DIFCO) jusqu'en début de phase stationnaire. Elles sont ensuite
 5 centrifugées et lavées dans du tampon d'électroporation (0,4 M sucrose, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM KH_2PO_4 , pH 6,0) et mises en suspension dans ce même tampon à une concentration correspondant à une DO_{600} d'environ 50. La suspension est incubée 20 min à 45°C puis refroidie sur de la glace. Une
 10 aliquote de 80 μ l de la suspension est mélangée avec l'ADN plasmidique (~1,5 μ g) et le mélange est transféré dans une cuve d'électroporation de 0,2 cm. L'électroporation est effectuée à 1 kV, 800 Ω , et 25 μ F.

Immédiatement après l'électroporation, le
 15 mélange est dilué dans 2 ml de milieu d'expression (0,2 M sucrose, 5% lait écrémé en poudre, 0,1% extrait de levure, 1% casaminoacides, 25 mM $MgCl_2$). Après incubation pendant 3 h à 37°C dans ce milieu, les cellules sont étalées sur des boîtes de milieu sélectif (MRS Agar avec
 20 10 μ g/ml d'érythromycine) ; les boîtes sont incubées en jarre d'anaérobiose à 37°C pendant 48 h, et les colonies résistantes à l'érythromycine sont sélectionnées.

Thermosensibilité de dérivés de pIP501 (réplication θ)

25 La thermosensibilité de pGB305 Δ et de pVI1055 a d'abord été évaluée par des essais de transformation de *Lb. delbrueckii*, selon le protocole décrit ci-dessus, avec des étalements sur milieu sélectif à 37°C et 42°C. Pour les 2 plasmides, on obtient des transformants à 37°C
 30 mais pas à 42°C.

La thermosensibilité de pVI1055 a ensuite été confirmée par comparaison de sa stabilité à 37°C et à 44°C. Une culture en MRS/Ery (10 μ g/ml) à 37°C a été diluée en MRS sans Ery puis incubée en parallèle à 37°C
 35 et à 44°C. Les cellules sont régulièrement diluées avec du milieu frais afin de les maintenir en phase

exponentielle de croissance. Des prélèvements sont effectués à différents temps, et les cellules sont étalées après dilution sur MRS et MRS/Ery, afin de déterminer la proportion de cellules ayant perdu le plasmide.

A 37°C, environ 30% des cellules ont perdu le plasmide pVI1055 après 48 heures. A 44°C, la stabilité de pVI1055 est nettement affectée puisque ~100% des cellules ont perdu le plasmide après 48 heures. Les résultats obtenus avec pVI1055 à 37°C (■) et à 44°C (□) sont illustrés par la Figure 4.

Thermosensibilité de plasmides à répllication cercle roulant dérivés de pVE6002

La thermosensibilité de pVE6004 et pVE6155 (pG+host9) a d'abord été évaluée par des essais de transformation de *Lb. delbrueckii*, selon le protocole décrit ci-dessus, la sélection des transformants étant effectué à 37°C ou 42°C. Des transformants ont été obtenus à 37°C mais pas à 42°C.

La stabilité de pVE6004 chez *L. bulgaricus* a été mesurée à 37°C et 44°C après 22 heures (environ vingt générations)

Les résultats sont illustrés par la Figure 5, qui montre la stabilité de pVE6004 à 37°C (■) et son instabilité à 44°C (□). Des résultats semblables ont été obtenus avec pG+host9.

EXEMPLE 2 : MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE DE TRANSPOSITION DE SEQUENCES D'INSERTION (IS) CHEZ *Lb. delbrueckii*.

Des séquences d'insertion isolées de bactéries lactiques ont été clonées dans pVI1055. A température permissive pour la répllication du plasmide, la multiplication d'un transformant génère une population bactérienne contenant le plasmide. L'IS présente sur le plasmide dans la population bactérienne peut transposer dans le chromosome. En cas de transposition répllicative

de l'IS, la structure transposée présente dans le chromosome, correspond au vecteur plasmidique, encadré de part et d'autre par une copie de l'IS, comme le montre la Figure 6. On peut également observer parfois une
 5 transposition en tandem ; la structure comprend alors plusieurs copies du plasmide. Le gène de résistance à l'érythromycine (Ery^R) présent dans la structure transposée permet la sélection des transposants.

A température non permissive (44°C), seules
 10 les bactéries ayant subi un événement de transposition répllicative restent Ery^R car le vecteur fait partie de la structure transposée, intégrée dans le chromosome. Les bactéries n'ayant pas subi de transposition perdent, au fur et à mesure des générations, le plasmide qui est
 15 instable à cette température.

Les IS transposant selon un mode réplcatif chez *L. bulgaricus* conduisent à l'obtention de clones Ery^R à 44°C avec une fréquence supérieure à celle observée pour pVI1055, le plasmide sans IS. Dans le cas
 20 d'obtention de clones Ery^R, l'analyse structurale de l'ADN chromosomique par Southern Blot, permet de vérifier que l'intégration résulte bien d'un événement de transposition.

Après extraction de l'ADN chromosomique, une
 25 digestion BglI permet de générer un fragment d'au moins 6,7 kb (taille du plasmide pVI1055) porteur d'une IS, et un second fragment au moins égal à la taille de l'IS testée. Ces fragments sont révélés par hybridation avec une sonde correspondant à l'IS testée. Dans le cas de
 30 transposition en tandem le plasmide est présent à plusieurs copies dans la structure transposée. Une troisième bande de la taille du plasmide (6,7 kb) est alors révélée lors de l'hybridation.

Mise en évidence de la transposition :

35 Les IS 1223 (WALKER and KLAENHAMMER, 1994, référence précitée), et 1201 (TAILLEZ et al., 1994,

référence précitée) ont été clonées dans le plasmide pVI1055, au site *Bss*HII, générant respectivement les plasmides pVI48, pVI49, pVI51, pVI52.

Les propriétés de ces 2 IS et la nature des plasmides obtenus sont indiquées dans le tableau 1 ci-après.

TABLEAU I

IS	Origine	Taille ^a (pb)	Vecteurs finaux ^b
1223	<i>L. jonshonii</i>	1502	pVI48/pVI49
1201	<i>L. helveticus</i>	1387	pVI51/pVI52

a: taille correspondant à l'IS encadrée des répétitions directes (DR)

b: La mention de deux plasmides indique que l'IS a été clonée dans les deux orientations

2 protocoles ont été utilisés pour tester l'activité de transposition des IS chez *Lb. delbrueckii*.

Dans le premier, les souches contenant les plasmides porteurs des IS à tester ont été cultivées à 37°C en MRS/Ery (10 µg/ml). A DO₆₀₀ ~0,1, les cellules sont diluées en MRS ne contenant pas d'antibiotique et incubées à 44°C. Elles sont maintenues en phase exponentielle de croissance par dilutions régulières en MRS. A différents temps, des échantillons sont prélevés et étalés sur boîtes MRS (pour déterminer le compte de cellules viables) et sur MRS/Ery (compte de cellules Ery^R) qui sont incubées à 42°C. La souche portant le plasmide pVI1055 est utilisée en contrôle négatif et permet d'évaluer la perte du plasmide durant l'incubation à 44°C.

Etant donné le temps de croissance des souches avant la sélection des transposants, cette méthode peut conduire à la dominance de certains transposants dans la population. C'est pourquoi une autre méthode, mettant en œuvre une sélection plus précoce des intégrants, a également été utilisée.

Dans ce second protocole, une population bactérienne contenant le plasmide pVI52 ou pVI49 a été générée par croissance en MRS/Ery (10 µg/ml) à température permissive (37°C). Les cellules ont été

ensuite directement étalées sur boîtes MRS/Ery puis incubées à 42°C, afin d'individualiser au plus tôt les transposants.

Résultats

5 **IS1223 (pVI48/pVI49)** : Les plasmides pVI48 ou pVI49 ont été introduits chez VI104. En présence de l'IS1223, la fréquence des cellules Ery^R est 50 (pVI48) à 1000 (pVI49) fois plus élevée qu'avec pVI1055 seul. Après digestion, les ADN chromosomiques de 90 clones Ery^R,
10 obtenus par le premier protocole et provenant de 4 expériences indépendantes, sont hybridés avec l'IS1223. Dans tous les cas, deux bandes ont été révélées, confirmant que les clones résultent d'événements de transposition répllicative. Cependant, on observe aussi la
15 dominance de certains transposants dans la population.

L'analyse d'autres clones, obtenus par le second protocole décrit ci-dessus, indique qu'il y a également transposition, et confirme que ce protocole réduit l'enrichissement en certains transposants.

20 **IS1201 (pVI51/pVI52)** : les plasmides pVI51 ou pVI52 ont été introduits dans VI104.

La fréquence d'insertion de pVI52 est au moins 1000 fois plus élevée que celle de pVI1055 seul. Parmi les 28 transposants de pVI52 analysés par Southern :

- 25 - 18 résultent de transposition en tandem ;
 - 10 résultent de transposition monocopie et présentent 4 profils différents de transposition répllicative.

Aucun transposant n'a été obtenu avec pVI51, ce qui suggère que, dans le cas de l'IS1201 l'orientation de l'IS dans le vecteur pourrait jouer un rôle dans l'efficacité de la transposition.

30 L'analyse de 8 autres clones, obtenus par le second protocole décrit ci-dessus, indique qu'il y a également transposition, et confirme que ce protocole
35 réduit l'enrichissement en certains transposants.

Ces résultats démontrent l'activité de transposition répllicative des IS 1223 et 1201 chez *Lb. delbrueckii*.

REVENDICATIONS

1) Procédé pour modifier l'information génétique portée par le chromosome d'une bactérie de l'espèce *Lb. delbrueckii*, caractérisé en ce qu'il

5 comprend :

- a) la construction d'un plasmide intégratif, par insertion d'au moins une séquence d'ADN capable de s'intégrer dans le chromosome bactérien, dans un vecteur conditionnel chez ladite bactérie, ledit vecteur
- 10 portant en outre au moins un marqueur de sélection ;
- b) l'introduction du plasmide dans ladite bactérie et la multiplication de celle-ci, en conditions permissives pour la réplication et le maintien sous forme stable dudit plasmide ;
- 15 c) la multiplication des bactéries exprimant au moins un marqueur de sélection du plasmide à l'issue de l'étape b) en conditions non-permissives pour la réplication et/ou le maintien sous forme stable dudit plasmide ; et optionnellement,
- 20 d) la récupération des bactéries exprimant au moins un marqueur de sélection provenant du plasmide, à l'issue de l'étape c).

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :

- 25 e) l'excision des séquences provenant du vecteur, par multiplication des bactéries exprimant à l'issue de l'étape c), au moins un marqueur de sélection provenant du plasmide, et avantageusement,
- f) l'élimination de l'ADN excisé, par multiplication des
- 30 bactéries obtenues à l'étape e) en conditions non-permissives pour la réplication et le maintien dudit vecteur sous forme plasmidique stable.

3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit

35 vecteur conditionnel est un vecteur thermosensible chez *Lb. delbrueckii*.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit vecteur thermosensible chez *Lb. delbrueckii* est choisi parmi les plasmides comprenant le système de répllication du réplicon mutant pWV01Ts, et les plasmides comprenant le système de répllication thêta de pIP501.

5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence d'ADN capable de s'insérer dans le chromosome bactérien est une séquence homologue d'une portion du chromosome où l'on souhaite introduire une modification.

6) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence d'ADN capable de s'insérer dans le chromosome bactérien est une séquence transposable.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ladite séquence transposable est une séquence d'insertion.

8) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite séquence d'insertion est choisie parmi IS1223 de *Lb. johnsonii* et IS1201 de *Lb. helveticus*.

9) Plasmide intégratif pour la mise en œuvre d'un procédé selon une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il résulte de l'insertion de l'une des séquences IS1223 ou IS1201 dans un plasmide choisi parmi :

- les plasmides comprenant le système de répllication du réplicon pWV01Ts ;
- les plasmides comprenant le système de répllication du réplicon pIP501.

10) Plasmide intégratif selon la revendication 9, choisi dans le groupe constitué par le plasmide pVI49 et le plasmide pVI52, déposés auprès de la CNCM le 17 septembre 1999, sous les numéros respectifs I-2317 et I-2318.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit vecteur thermosensible chez *Lb. delbrueckii* est choisi parmi les plasmides comprenant le système de répllication de pVE6002, et les plasmides
5 comprenant le système de répllication thêta de pIP501.

5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence d'ADN capable de s'insérer dans le chromosome bactérien est une séquence homologue d'une portion du chromosome où
10 l'on souhaite introduire une modification.

6) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence d'ADN capable de s'insérer dans le chromosome bactérien est une séquence transposable.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ladite séquence transposable est une séquence d'insertion.
15

8) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite séquence d'insertion est choisie parmi IS1223 de *Lb. johnsonii* et IS1201 de *Lb. helveticus*.
20

9) Plasmide intégratif pour la mise en œuvre d'un procédé selon une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il résulte de l'insertion de
25 l'une des séquences IS1223 ou IS1201 dans un plasmide choisi parmi :

- les plasmides comprenant le système de répllication de pVE6002 ;
 - les plasmides comprenant le système de répllication du réplicon pIP501.
-
- 30

10) Plasmide intégratif selon la revendication 9, choisi dans le groupe constitué par le plasmide pVI49 et le plasmide pVI52, déposés auprès de la CNCM le 17 septembre 1999, sous les numéros respectifs I-2317 et I-
35 2318.

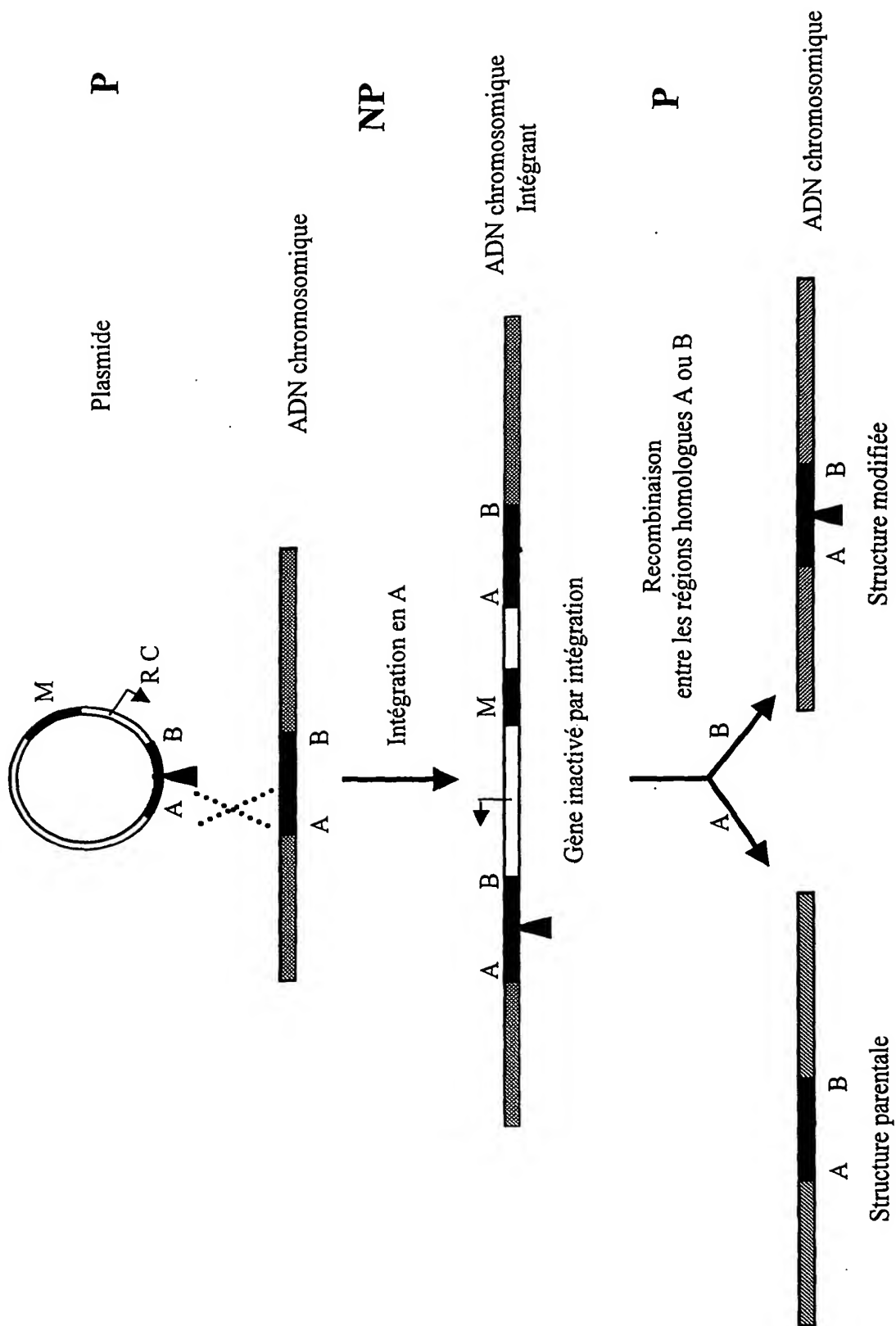


Figure 1

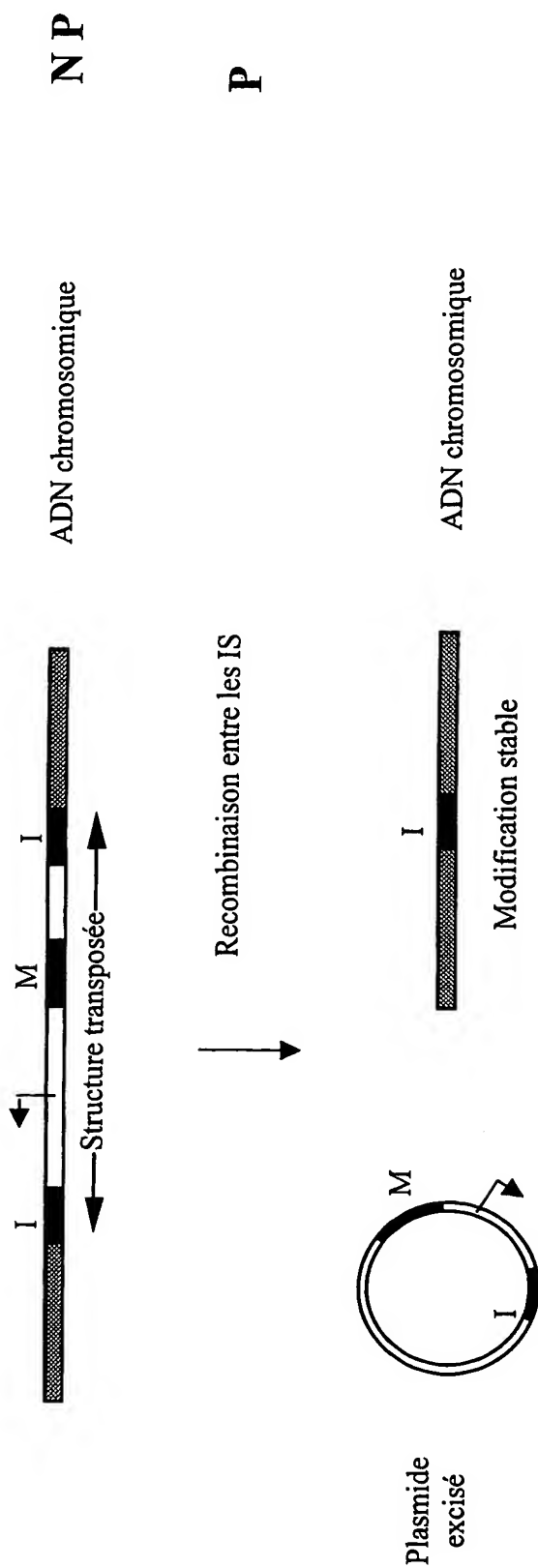


Figure 2

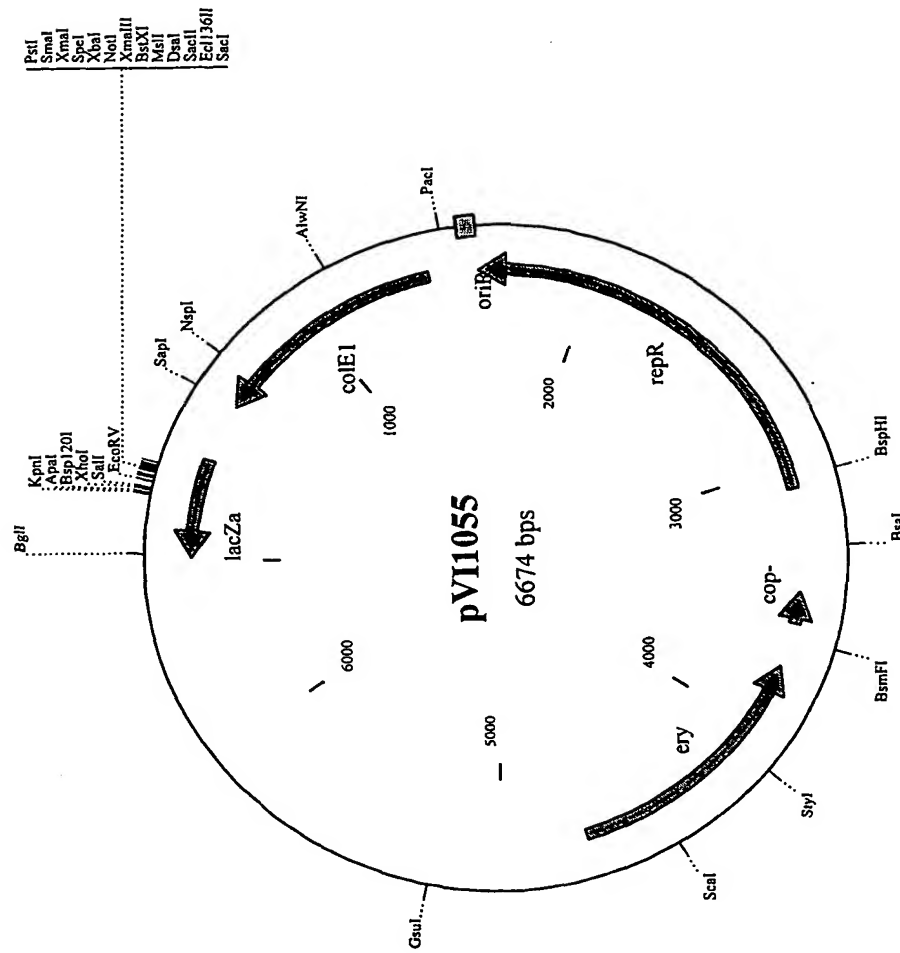


Figure 3

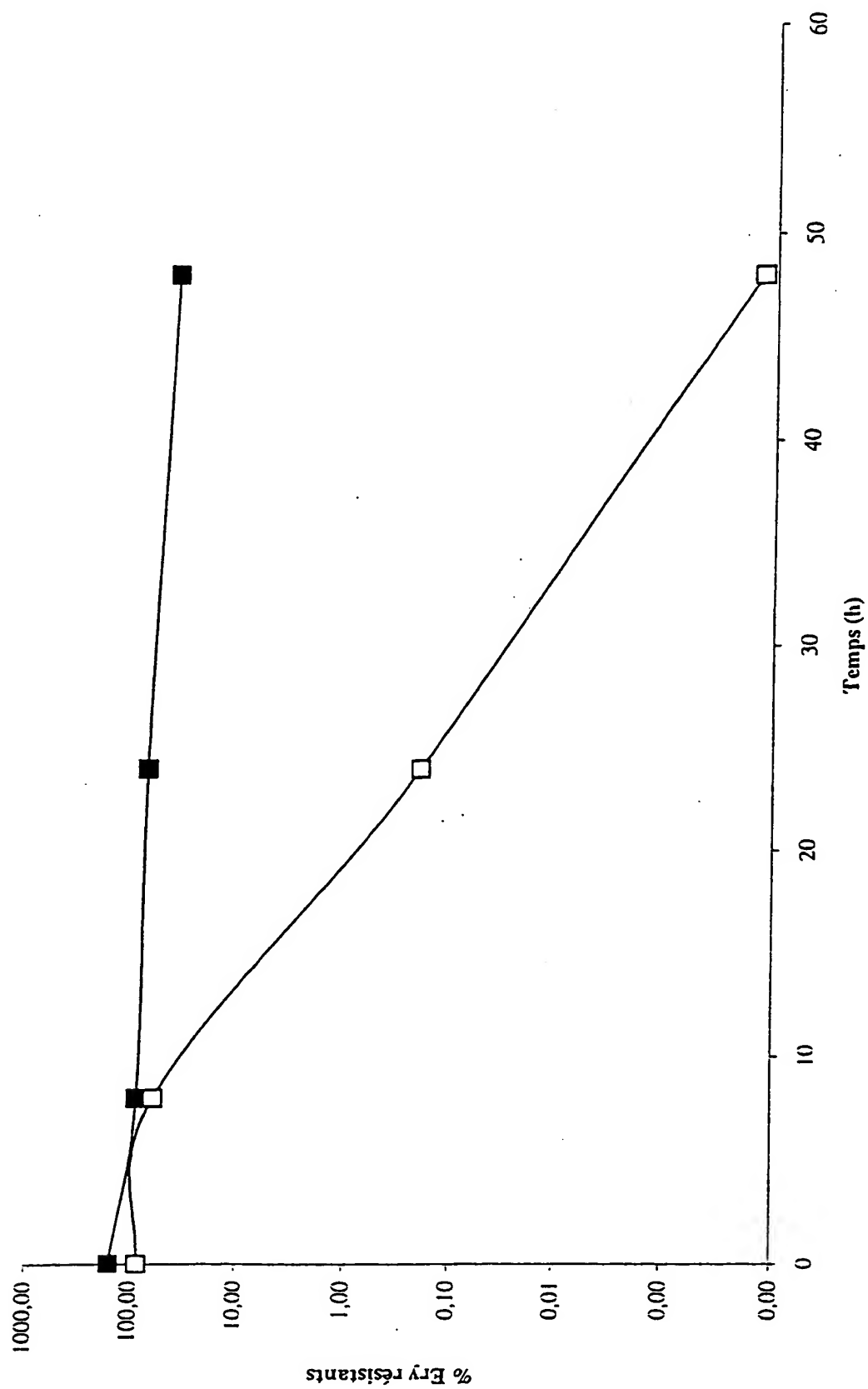


Figure 4

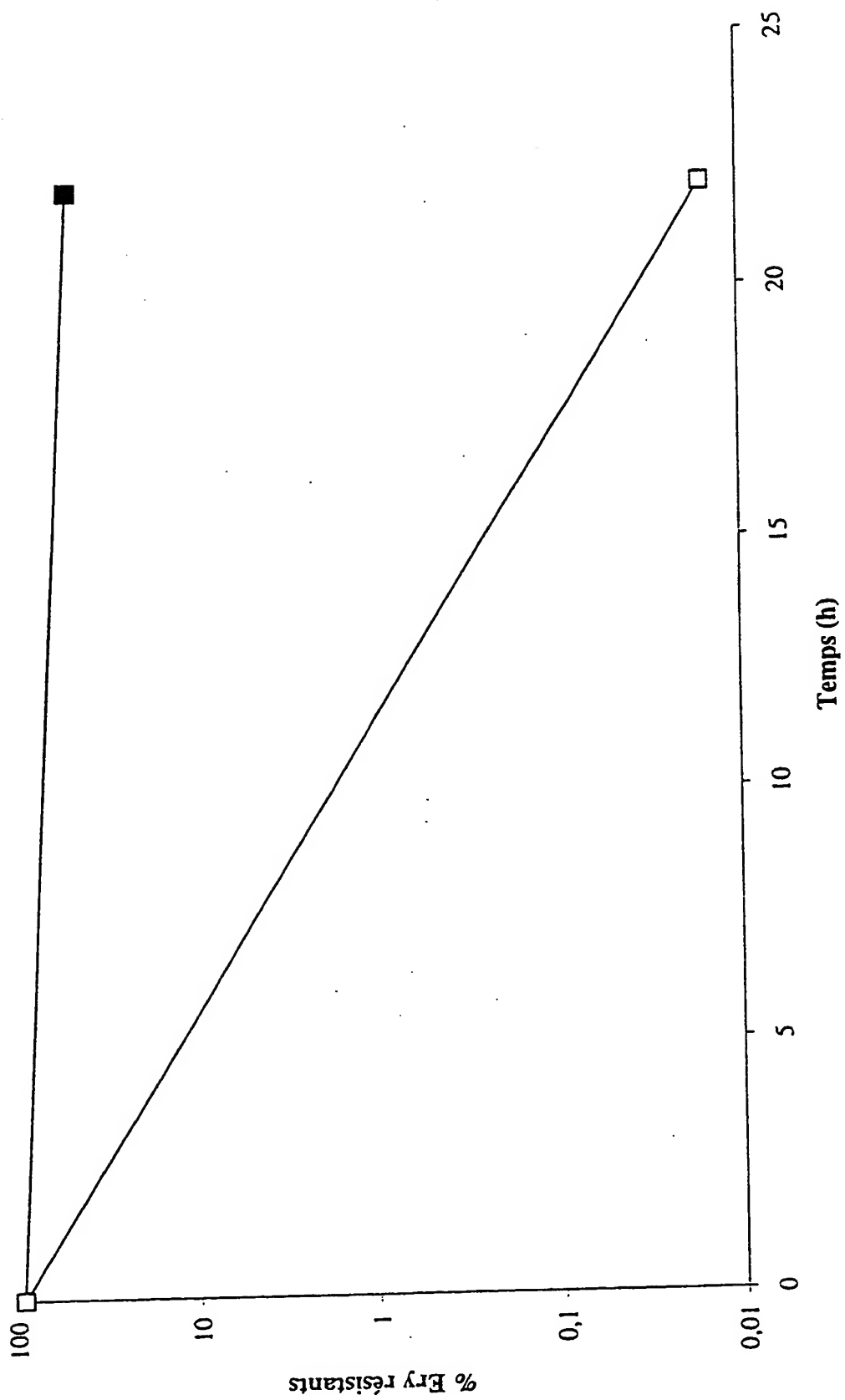


Figure 5

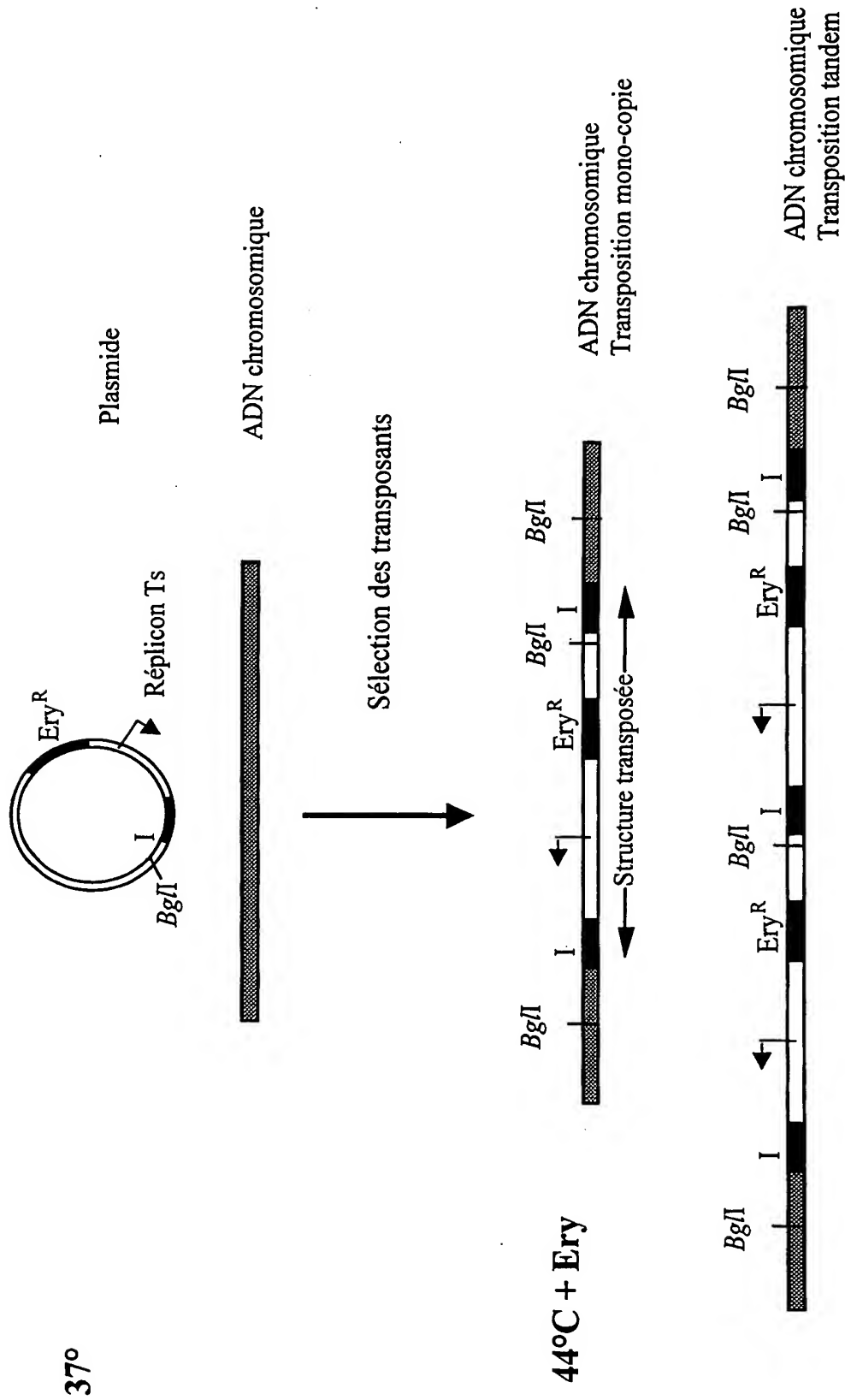


Figure 6

